

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08333213 A**

(43) Date of publication of application: **17.12.96**

(51) Int. Cl **A01N 63/00**
A01N 37/42
A01N 43/16
A01N 59/16
A01N 59/20
A01N 63/02
A61K 31/725
A61K 31/725

(21) Application number: **07168217**
(22) Date of filing: **09.06.95**

(71) Applicant: **TEIKA CORP**
(72) Inventor: **OISO YOICHI**

(54) ANTIVIRAL AND ANTIMICROBIAL AGENT

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain an antiviral and antimicrobial agent without manifesting anticoagulating properties in spite of excellent antiviral and antimicrobial activities possessed thereby by using an antimicrobial metallic salt of polysaccharides, produced by a microorganism which is not a pathogenic bacterium of the genus Azotobacter and has high safety.

CONSTITUTION: This antiviral and antimicrobial agent is obtained by using an antimicrobial metallic salt of polysaccharides containing constituent saccharides comprising D-galacturonic acid, L-rhamnose and D-glucose at (0.6-1.0):(0.8-1.2):(0.8-1.2) constituent molar ratio of the D-galacturonic acid; L-rhamnose:D-glucose, especially the binding mode of the respective constituent saccharides of the polysaccharides

is preferably substantially 1,3-bond (or 1→3). The molecular weight of the polysaccharides measured by using the gel filtration chromatography is preferably about 5×10^3 to 10×10^6 . At least one or more selected from among copper, zinc and silver are preferably used as the antimicrobial metal.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-333213

(43)公開日 平成8年(1996)12月17日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 01 N	63/00		A 01 N 63/00	A
	37/42		37/42	
	43/16		43/16	A
	59/16		59/16	A
				Z
			審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 7 頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号 特願平7-168217

(22)出願日 平成7年(1995)6月9日

(71)出願人 000215800

ティカ株式会社

大阪府大阪市大正区船町1丁目3番47号

(72)発明者 大磯洋一

大阪市大正区船町1丁目3番47号 ティカ
株式会社内

(54)【発明の名称】 抗ウイルス・菌剤

(57)【要約】

【構成】 構成糖が、D-ガラクトロン酸、L-ラムノースおよびD-グルコースの3種から成り、その構成モル比が、D-ガラクトロン酸：L-ラムノース：D-グルコース=0.6～1.0：0.8～1.2：0.8～1.2である多糖類を有効成分とする抗ウイルス・菌剤。

【効果】 安全性ならびに生分解性がより高い微生物産生多糖類の抗菌性金属塩より成る抗ウイルス・菌剤が提供される。該抗ウイルス・菌剤は、これらの性質を具備することにより、特に、医薬品分野における抗ヘルペスウイルスホミニス(HVH)剤、抗ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)剤、抗白癖剤、抗歯垢剤、創傷、火傷時の微生物感染予防・治療剤など、化粧品分野における抗フケ剤、にきび予防・治療剤、防腐剤など、農業、林業における病害防除剤などとして優れた効果を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項1】構成糖が、D-ガラクトロン酸、L-ラムノースおよびD-グルコースの3種からなり、その構成モル比が、D-ガラクトロン酸：L-ラムノース：D-グルコース=0.6～1.0：0.8～1.2：0.8～1.2である多糖類の抗菌性金属塩を有効成分とする抗ウイルス・菌剤。

【請求項2】多糖類の各構成糖の結合様式が実質的に1、3結合（または1→3）であることを特徴とする請求項1に記載の抗ウイルス・菌剤。

【請求項3】抗菌性金属が、銅、亜鉛、銀からなる群のうちの少なくとも1種以上である請求項1～2のいずれか1項に記載の抗ウイルス・菌剤。

【請求項4】ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて測定した多糖類の分子量が、約 5×10^3 ～ 10×10^6 である請求項1～3のいずれか1項に記載の抗ウイルス・菌剤。

【請求項5】請求項1～4のいずれか1項に記載の抗ウイルス・菌剤を含有する抗ウイルス・菌剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、特定多糖類を有効成分とする抗ウイルス・菌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、銀、銅、亜鉛、錫、水銀、鉛、鉄、コバルト、ニッケル、マンガン、ヒ素、アンチモン、ビスマス、バリウム、カドミウム、クロムなどが抗菌性金属として知られており、種々の形態で抗菌剤などとして使用されている。

【0003】具体的な例としては、抗ウイルス活性を有するヘパリン亜鉛塩（特公昭62-25126号公報）、同じく抗ウイルス活性を有するデキストラン硫酸亜鉛塩（特公昭63-48849号公報）、病原菌に対する抗菌活性を有するヒアルロン酸重金属塩（特表昭63-502670号公報）などが挙げられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述の抗菌性金属イオンを対イオンとする化合物には、アニオニン部分、あるいは、生産経路に次に示した問題を抱えている。

(1) ヘパリンは抗凝血活性を有しており、患部が出血している場合などには使用することができない。

(2) ヒアルロン酸は生産性の有利さから、動物由來のものから微生物由來のものへと移行してきたが、ヒアルロン酸を生産する微生物は何れも連鎖球菌で、人間や家畜に寄生し、病原性を持つものが多く、医薬品、化粧品、食品分野などの高い安全性が求められる分野での使用は慎重に成らざるをえない。

【0005】従って、医薬品分野においても使用が制限されることがなく、また、生産経路上においても何ら安

全性に問題のない、抗菌性金属イオンを対イオンとすることができる物質が求められている。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、優れた抗ウイルス・菌性能と人体に対する安全性を有する新規な抗ウイルス・菌剤を提供することにある。本発明者らは、前記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、病原性細菌ではないアゾトバクター属の微生物が生産する、安全性の高い多糖類が、抗菌性金属を対イオンとして含有させることが可能であり、優れた抗ウイルス・菌性を有するが、抗凝血性を示さないことを見出し、本発明に到達したものである。

【0007】すなわち本発明は、構成糖が、D-ガラクトロン酸、L-ラムノースおよびD-グルコースの3種からなり、その構成モル比が、D-ガラクトロン酸：L-ラムノースおよびD-グルコース=0.6～1.0：0.8～1.2：0.8～1.2であることを特徴とする多糖類の抗菌性金属塩を有効成分とする新規抗ウイルス・菌剤である。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の抗ウイルス・菌剤として用いられる多糖類は、上述の特徴の他に、以下のよう特性を有しているのが好ましい。

【0009】分子量：ゲルろ過クロマトグラフィーにて測定した分子量が、約 5×10^3 ～ 10×10^6 である。

【0010】結合様式：各構成糖の結合様式が、実質的に(1→3)結合である。

【0011】結合配置：D-ガラクトロン酸の結合配置が α 、L-ラムノースの結合配置が β 、D-グルコースの結合配置が α である。

【0012】O-アセチル基含有量：多糖類における水酸基(-OH)の一部が、O-アセチル基(-OCOC_H₃)として置換されており、そのO-アセチル基の数は、通常平均して、単位構成糖3あたり1以下である。

【0013】また、さらに上記多糖類は、以下の物性を有している。

性状：白色纖維状（凍結乾燥物）。

【0014】溶解性：水、希酸、希アルカリ、DMSO40に対して可溶であり、メタノール、エタノール、アセトンに対して不溶である。

【0015】赤外吸収スペクトル：3400cm⁻¹付近、1620cm⁻¹付近、1110cm⁻¹付近、1250cm⁻¹付近、2950cm⁻¹付近のそれぞれに赤外吸収のピークが認められる。

【0016】呈色反応：フェノール硫酸法、カルバゾール硫酸法及びm-フェニルフェノール法のいずれも陽性。

【0017】本発明の抗ウイルス・菌剤として用いられる多糖類の分子量や構成糖の種類、それらの構成比、構

成糖の結合様式などは酸加水分解後のクロマトグラフィー分析、メチル化分析やスミス分解などにより特定が可能である。

【0018】上記多糖類の特定方法の具体例を次に示す。

分子量の測定：旭化成社製「Asahipak GFA-7MF」をカラムとするGPCモードの高速液体クロマトグラフィーを使用し、0.1M硝酸ナトリウム水溶液を移動相とし、分子量既知のブルランを標準サンプルとして作成した分子量一保持時間標準曲線を使用して測定する。

【0019】本件発明に使用する多糖類の物質特許出願は特開平7-90003号公報として公開されているが、次に、製造方法について説明する。通常、本件多糖類は、アゾトバクター・ベイジエリンキーTNM1株（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号FERM BP-4194）又はその変異株による微生物培養により、その培養物から採取される。上記変異株は、紫外線、X線等の放射線、または、エチルメタノスルホン酸(EMS)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)等の化学的突然変異誘発物質の様な公知の突然変異誘発手段により発生させることができる。

【0020】上記菌株を用いた微生物培養について、さらに詳細に説明する。本発明で用いる多糖類を产生する微生物を培養するための培地としては、アゾトバクター(Azotobacter)属に属する微生物が生育でき、上記多糖類を产生する炭素源、窒素源、無機塩類及び微量栄養源を適量含有するものであれば特に制限されない。

【0021】そして、炭素源としては、グルコース、ラクトース、マルトース、キシロース、マンニット、サツカロース、ラムノース、アラビノース、トレハロース、ラフィノースなどが使用される。窒素源としては、硝酸塩、アンモニウム塩、尿素などの合成化合物、ポリペプトン、コーンスティープリカー、酵母エキス、肉エキス、脱脂大豆抽出物、ペプチド、アミノ酸などの天然有機物が使用される。

【0022】無機塩類としては、リン酸塩、カリウム塩、硫酸塩、マグネシウム塩などが使用される。培地には、必要に応じ、鉄塩、カルシウム塩、マンガン塩などを添加することができる。また、微量栄養源としては、酵母エキス、各種ビタミン類などが使用される。

【0023】培地の状態は、固体でも液体でも構わない。液体培地を使用する場合には、静置培養でもよいが、振盪培養、通気攪拌培養の方が、より高収量に本発明で使用する多糖類を得ることができる。培養時のpHは、微生物が生育できて本発明で使用する多糖類を生産し得るpHであれば特に制限されないが、通常は4~8のpHが適切である。培養温度についても、特に制限さ

れないが、通常は20~35°Cが適切である。培養時間は、本発明で使用する多糖類の生産が最大に達する期間が選ばれるが、通常は1~7日が適切である。

【0024】上記の培養方法で得られた培養物から、本発明で使用する多糖類を採取する方法としては、従来公知の方法を採用することができる。たとえば、まず、遠心分離やろ過などにより、培養物から菌体を除去した後、得られた培養液にメタノール、エタノール、イソブロパノール、アセトンなどの有機溶媒を加えて沈殿を生じさせる。次いで、沈殿物を水に溶解させた後、水に対して透析を行ない、通風乾燥、熱風乾燥、噴霧乾燥、ドライヤー乾燥、減圧乾燥、凍結乾燥などの方法により、透析内液を乾燥して多糖類を回収する。

【0025】上記の採取方法の他に、限外ろ過により、上記の培養液から本発明で使用する多糖類以外の成分を除去し、得られた濃縮液を上述の乾燥工程に供する方法を採用してもよい。さらに、必要に応じ、通常の多糖類の精製法に従って精製することにより、高純度精製品を得ることもできる。精製法としては、イオン交換、ゲルろ過、アフィニティー等の各種のカラムクロマトグラフィー、4級アンモニウム塩による沈殿や塩析、有機溶媒による沈殿などが採用される。

【0026】本発明で用いる多糖類の重合度は、製造時の培地組成、採取法などの条件を調節することによって変化させることができる。また、TFA、ギ酸、塩酸などを使用し、かつ、条件を調節することにより、採取品や精製品を加水分解することができる。さらに、具体的な方法として、加圧下での加温や、超音波処理などを行って重合度を変化させても、好適な結果が得られる。

【0027】従って、上記多糖類の分子量は、約 $5 \times 10^3 \sim 10 \times 10^6$ の範囲で自由に調節することが可能である。

【0028】そして、上述した微生物培養により、その培養物から採取される本発明で用いる多糖類は、D-ガラクトツロン酸、L-ラムノースおよびD-グルコースの3種の構成糖から成り、その構成モル比が、D-ガラクトツロン酸:L-ラムノース:D-グルコース=0.6~1.0:0.8~1.2:0.8~1.2の範囲にあることが、前述した分析手段により明らかになった。

【0029】上記説明した本発明で用いる多糖類は、微生物を培養することによって製造が可能である。この場合、アゾトバクター・ベイジエリンキーが使用され、さらに好ましくは、微生物として天然土壤から純粋分離したアゾトバクター・ベイジエリンキーTNM1株(FERM BP-4194)、または、その変異株が使用される（たとえば、特開平7-90003号公報参照）。変異株は、紫外線、X線などの放射線またはエチルメタノスルホン酸(EMS)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)などの化学的突然変異誘発物質の様な公知の突然変異誘発手段により発

生させることが出来る。

【0030】上記菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所において、受託番号「FERM BP-4194」として、平成5年2月18日から国際寄託され保管されている。

【0031】このようにして得られる、本発明で用いる多糖類は、抗菌性の金属と組み合わせることにより抗ウイルス・菌活性を示すが、抗凝血性は示さない。また、本発明で用いる多糖類は、抗菌性金属塩にしても水溶性であるので、種々の抗菌性金属を担持して各分野で使用されている抗菌性ゼオライトや、抗フケ剤として用いられている2-メルカプトピリジン-N-オキシド亜鉛塩(Zpt)などの水不溶性抗菌剤のように、溶液中で使用する際に分散剤などの添加を必要としない。ただし、必要に応じて、水不溶性とすることもできる。

【0032】本発明の抗ウイルス・菌剤の具体的な用途としては、従来から抗菌性金属によって抗ウイルス・菌作用を受けることが知られているウイルス、微生物の増殖を阻害することに基づく用途を挙げることができ、医薬品分野における抗ヘルペスウイルスホミニス(HV-H)剤、抗ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)剤、抗白癬剤、抗歯垢剤、創傷、火傷時の微生物感染予防・治療剤など、化粧品分野における抗フケ剤、にきび予防・治療剤、防腐剤など、農業、林業分野における病害防除剤などとしての用途が可能である。

【0033】安全性データ

本発明で用いる多糖類の安全性データを測定したところ、次の結果が得られた。

急性経口毒性(ラット、LD₅₀) : > 5000 mg/kg (實際上無害)

皮膚1次刺激性(Draize法) : 1次刺激指数0.3 (弱い刺激物)

【0034】前記の結果より本件多糖類は、急性経口毒性が實際上無害であり、1次刺激指数が表1から明らかなように、ほぼ、無刺激物に近いレベルの刺激性を示す程度であって安全性の高い物質である。

【0035】

【表1】

皮膚刺激性評価	1次刺激指数(PII)
無刺激物	0
弱い刺激物	0 < PII ≤ 2
中等度の刺激物	2 < PII ≤ 5
強い刺激物	5 <

【0036】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0037】多糖類の製造例1

500ml容の坂口フラスコに表1に示したような組成の培地を100ml入れ、121℃で20分間温熱滅菌

後、表1に示す組成の培地を用いて試験管で3日間液体振盪培養していたアゾトバクター・ベイジェリンキー(Azotobacter beijerincki i) TNM1株(FERM BP-4194)を、一白金耳分植菌し、振盪数毎分110ストローク、28℃で1日間レシプロ振盪培養を行った。

【0038】

【表2】

培地組成(重量%)

10	スクロース	3
	硝酸ナトリウム	0.3
	リン酸一水素カリウム	0.15
	硫酸マグネシウム・7水和物	0.05
	硫酸鉄・7水和物	0.001
	塩化カルシウム・2水和物	0.1
	pH	6.5

【0039】上記表2と同様の組成の培地6リットルを入れて前記と同様の滅菌を行った10リットル容のジャーファーメンターに、上記で得られた培養液300ml 20を接種し、温度28℃、通気量6リットル/miの条件下で、5M水酸化ナトリウムを用いて系中のpHを7に保ちながら、70時間通気搅拌培養を行った。尚、回転数は、培養24時間目までは400rpm、それ以降70時間までは700rpmとした。

【0040】得られた培養物を水で10倍に希釈し、90℃まで加温した後、遠心分離により菌体を除去した。得られた培養上清について、残留培地成分などの多糖類以外の成分が除去されるまで、クロスフロー方式の限外ろ過を繰り返した。限外ろ過には、東ソー社製、限外ろ過システム「UF-LMS II」(分子量: 3 × 10⁶)を使用した。限外ろ過膜を透過しなかった濃縮液を凍結乾燥し、培地1リットル当たり、約12gの単一な多糖類を得た。

【0041】なお、多糖類の单一性の確認は、GPCモードの高速液体クロマトグラフィーを使用して行った。

【0042】旭化成社製「Asahipak GFA-7MF」をカラムとし、0.1M硝酸ナトリウム水溶液を移動相とした高速液体クロマトグラフィーを使用し、前記した製造例の多糖類の分子量を測定した結果、多糖類のクロマトグラフのピークトップの保持時間は、分子量既知のフルランを標準サンプルとして作成した分子量-保持時間標準曲線において、分子量約2 × 10⁶に相当する値を示した。

【0043】また、この多糖類およびガラクツロン酸残基のカルボキシル基を還元した多糖類について、各構成糖まで加水分解を行い、アルジトールアセテートに誘導した後、ガスクロマトグラフィー分析を行った。あらかじめ作成した検量線と各構成糖のピーク面積から各構成糖のモル比を求めたところ、各構成糖のモル比は、D-ガラクツロン酸:L-ラムノース:D-グルコース=

0. 9 : 1 : 1 であった。

【0044】さらに、製造例で得られた多糖類における水酸基の修飾度合いについて調べるために、0. 01Mの水酸化カリウム及び0. 13Mの塩化カリウム水溶液中で、室温下5時間、脱アシル化処理を行った。処理試料の赤外吸収スペクトルを測定したところ、1730cm⁻¹近傍のピークが消失していた。

【0045】また、この処理試料の高速液体クロマトグラフィー分析を行ったところ、得られるピークの保持時間は、アセチル基が脱離した場合に生じる酢酸カリウムの存在を示し、さらに、そのピーク高さとあらかじめ作成した検量線とから、製造例で得られた多糖類におけるO-アセチル基含有量は、多糖類全体に対して約10重量%であることがわかった。この値は、およそで単位構成糖3個あたりに一つの水酸基が、O-アセチル基として置換されていることを意味する。

【0046】製造例2

抗菌性金属含有多糖類の製造は、製造例1で得られた多糖類の1% (w/v) 水溶液、500mlに、塩化銅 (CuCl₂ · 2H₂O), 2gをかきまぜながら添加した。限外ろ過による脱塩後、凍結乾燥することによって、ウロン酸残基の対イオンが銅イオンである多糖類を得た。

【0047】製造例3

製造例1で得られた多糖類の1% (w/v) 水溶液、500mlに、硫酸亜鉛 (ZnSO₄ · 7H₂O), 3gをかきまぜながら添加した。限外ろ過による脱塩後、凍結乾燥することによってウロン酸残基の対イオンが亜鉛イオンである多糖類を得た。

* 製造例2、3、4で得た

多糖類の抗菌性金属塩

Cu型としたもの

Zn型としたもの

Ag型としたもの

製造例1で得た多糖類

ブルラン

* 【0048】製造例4

製造例1で得られた多糖類の1% (w/v) 水溶液、500mlに、硝酸銀 (AgNO₃), 2gをかきまぜながら添加した。限外ろ過による脱塩後、凍結乾燥することによってウロン酸残基の対イオンが銀イオンである多糖類を得た。

【0049】実施例1 (抗菌性評価)

製造例2、3、4で得たガラクツロン酸残基をそれぞれ Cu, Zn, Ag型に置換した多糖類を、普通寒天培地

10 へ含有量が2% (w/v) となるように添加した。表4に示す組成の培地500mlを、121°Cで20分間湿熱滅菌後、2枚のシャーレ（直径90mm×高さ10mm）に25mlずつ入れた。実験室内で上記シャーレを2時間開放放置した後、インキュベーター内で37°Cで72時間放置した時のコロニー数を調べた。

【0050】比較のため、製造例1で得た多糖類そのものの（ガラクツロン酸残基の対イオンを抗菌性金属イオンに置換していない多糖類）およびブルラン（林原社製）についても同様な操作を行った。結果を表4に示す。

20 【0051】

【表3】

培地組成 (重量%)

肉エキス	0. 3
ポリペプトン	1. 0
塩化ナトリウム	0. 5
寒天	1. 5
pH	7. 0

【0052】

【表4】

2枚のシャーレの

コロニー数の合計

Cu型としたもの	4
Zn型としたもの	2
Ag型としたもの	1
製造例1で得た多糖類	67
ブルラン	68

※ 培地組成 (重量%)

肉エキス	0. 3
ペプトン	1. 0
40 塩化ナトリウム	0. 5
寒天	1. 5
pH	7

【0056】1時間後、製造例2～4で得られた抗菌性金属イオンを対イオンとした多糖類の2% (w/v) 水溶液中に浸したペーパーディスク（直径8mm）を、各細菌を添加（植菌）した培地上に置き、37°Cで48時間培養後の阻止円の直径を調べた。また、比較のため、製造例1で得た多糖類そのもの（ウロン酸残基の対イオンを抗菌性金属イオンに置換していない多糖類）とブルラン（林原社製）についても同様に処理した。結果を表

【0053】実施例2 (細菌に対する抗菌性評価)

細菌である *Bacillus subtilis*, *S taphylococcus aureus*, *Escherichia coli*、酵母である *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*、に対する抗菌性を以下に述べる方法で調べた。

【0054】表5に示す組成の培地、100mlを121°Cで20分間、湿熱滅菌後、シャーレ（直径90mm×高さ10mm）に20mlずつ流し込み、約40°Cに保っておいて、液体培養していた抗菌性評価に用いる細菌の培養液、0. 5mlを培地に均一に添加した。

【0055】

【表5】

6に示す。

【0057】

	B. subtilis	S. aureus	E. coli	S. cerevisiae
Cu型	1.1	1.0	1.1	9
Zn型	1.2	1.1	1.2	1.2
Ag型	1.4	1.1	1.3	1.3
製造例1で				
得た多糖類	0	0	0	0
ブルラン	0	0	0	0

【0058】上記の結果から明らかな通り、本発明で用いる多糖類は、構成糖であるウロン酸残基の対イオンを抗菌性金属イオンにすることにより、細菌や酵母に対し抗菌性を持つようになることがわかる。これに対して、ブルランでは、その構造から明らかなように、本質的に抗菌性金属イオンを置換することが出来ないため、同様の効果は発現しない。

【0059】実施例3 (多糖類の血液抗凝固性測定)
多糖類の血液抗凝固性を活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定することにより調べた。3.8%クエン酸ナトリウム液0.5mlに正常人より採血した血液4.5mlを加える。3300 rpmで10分間遠心分離して、血漿を採取する。血漿、0.1mlにセライト浮遊液(セライト、0.7gを生理食塩水、100mlに浮遊させたもの)、0.1mlを加え、1分間振る。これにケファリン浮遊液、0.1mlを加え、37℃で6分間保ったのち、0.025M塩化カルシウム液、0.1mlを吹き込み、凝固するまでの時間を測定したところ約45秒であった。次に製造例で得られた多糖類、0.05mgを含む3.8%クエン酸ナトリウム液、0.5mlを用いて上記と同じ操作を行なったところ、凝固時間は約45秒であったが、ヘパリンナトリウムを用いて本発明で使用する多糖類と同じ処理をしたが、凝固時間は約250秒であった。上述の結果から明らかなように、ヘパリンナトリウムでは血液抗凝固性が認められたが、本発明で使用する多糖類には血液抗凝固性は認められなかった。

【0060】実施例4 (多糖類生産性微生物の安全性)

製造例1と同様にして得た培養終了後の培養液の一部(800ml)を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物に蒸留水、60mlを加えて均一に分散した試料を、マウス(6週令、雌)に1日1回、1ml分を計6回経口投与したが、投与終了後、1ヶ月経ても何ら異常は認められなかった。なお、投与した菌体量は計50mgであった。

【0061】実施例5 (多糖類生産性微生物の安全性)

* 【表6】

*

阻止円の直径 (mm)

※製造例1における培養終了後の培養液、10mlをマウス(6週令、雌)の頭部以外のところに、ほぼ均一に塗布したが、一ヵ月後、何ら異常は認められなかった。

【0062】実施例6 (抗菌性ゲルの調製)
製造例1で得た多糖類の2%(w/v)水溶液に5M水酸化ナトリウムを添加してpHを1.2に調整し、5時間がかきませた後、限外ろ過による脱塩を行った。脱塩終了後の水溶液を1%(w/v)硫酸亜鉛(ZnSO₄·7H₂O)水溶液中に滴下して、水不溶性の球状ゲルを得た。また、このゲルを50℃の乾燥機に入れ、ゲル中の水分を蒸発させた後、乳鉢で粉碎して水不溶性の抗菌性多糖類を調製した。

【0063】実施例7 (抗ウイルス性の評価)
本発明の多糖類の抗ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)性を次の方法で評価した。

【0064】製造例4で得られた多糖類をMEM(2%牛胎仔血清を含む、以下2%MEMと表す)培地に、濃度が70μg/mlになるように溶解したものとHCMV₂×10³pfu/mlとを等量混合し、時々、かきまぜながら、室温で1時間インキュベートした。インキュベート終了後の液、0.5mlをヒト胎児肺細胞(HEL, 10-14代)1×10⁴cellsに感染させ、CO₂インキュベーターで37℃、72時間培養した。

【0065】72時間インキュベート後、抗ウイルス活性を「Microtrak」キット(Syva社製)を用いた蛍光抗体染色法により行なった。この方法では、蛍光染色される細胞が少ないほど、抗ウイルス活性は高いと評価されるが、蛍光顕微鏡の一視野中の蛍光染色陽性細胞数を測定したところ、コントロールでは約30で

40 あったのに対して、本発明の多糖類をHCMVに作用させた場合では6であった。

【0066】実施例8 (抗菌性化粧料の調製)
表7に示す処方によりクリームを調製した。すなわち、(1)~(7)、(11)を加熱溶解し、70℃に保つ(油相)。(8)~(10)を(12)に加熱溶解したものに、かきませながら油相を加える。ホモミキサー処理した後、急冷してクリームを得た。

【0067】

11		12
(1) ワセリン	8. 0	
(2) ラノリン	2. 0	
(3) スクワラン	20. 0	
(4) セタノール	5. 0	
(5) モノステアリン酸グリセロール	2. 0	
(6) ポリオキシエチレンモノラウリン酸ソルビタン (20EO)	2. 0	
(7) パラオキシ安息香酸エチル	0. 2	
(8) 製造例2で得られた多糖類	0. 5	
(9) グリセロール (86%)	5. 0	
(10) 1、3-ブチレングリコール	5. 0	
(11) 香料	0. 1	
(12) 精製水	50. 2	

【0068】実施例9 (抗菌性化粧料の調製)

実施例8において製造例2で得られた本発明で使用する多糖類の代わりに製造例3で得られた本発明で使用する多糖類を用いて、実施例8と同じ方法でクリームを調製した。

【0069】実施例10 (抗菌性化粧料の調製)

実施例8において製造例2で得られた本発明で使用する多糖類の代わりに製造例4で得られた本発明で使用する多糖類を用いて、実施例8と同じ方法でクリームを調製した。

【0070】実施例11 (抗ウイルス製剤の調製)

カルボキシメチセルロースナトリウム塩、200gとポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、50gとをグリセリン、1000g、蒸留水、6.5Lに均一に混合する。そこに、製造例3で得られた本発明で使用する多糖類、200gとポリオキシエチレンモノオレート、10gとを溶解した水溶液、2Lを添加し、よくかきませた後、蒸留水を加えて全量を10Lにした。得られたゲル様物をチューブに詰めて、抗ウイルス製剤を調製した。

【0071】実施例12 (抗ウイルス製剤の調製)

* 実施例11において、製造例3で得られた本発明で使用する多糖類の代わりに製造例4で得られた本発明で使用する多糖類を用いて、実施例11と同じ方法で抗ウイルス製剤を調製した。

【0072】上記各実施例の結果から、多糖類中のガラクトロン酸残基をCu、Zn、Ag型にすることによって、本発明の抗ウイルス・菌剤は、ブルランには認められない抗ウイルス・菌性を持つようになることが明らかである。

【0073】

【発明の効果】以上説明した通り、本発明によれば従来の抗ウイルス・菌剤にはない、多糖類を成分とする優れた性質を有する抗ウイルス・菌剤を提供することができる。本発明の抗ウイルス・菌剤は、医薬品分野における抗ヘルペスウイルスホミニス(HHV)剤、抗ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)剤、抗白癬剤、抗歯垢剤、創傷、火傷時の微生物感染予防・治療剤などや、化粧品分野における抗フケ剤、にきび予防・治療剤、防腐剤など、農業、林業分野における病害防除剤などに優れた効果がある。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 N 59/20			A 0 1 N 59/20	Z
63/02			63/02	D
A 6 1 K 31/725	AD Y		A 6 1 K 31/725	AD Y
	AD Z			AD Z